

A LIRE AVANT DE COMMENCER

Les parties I et II sont indépendantes l'une de l'autre.

Vous devez respecter la nomenclature du texte.

Tout doit être rédigé en écrivant les génotypes et les phénotypes (= entre 100% et 50 % des points)

Chez la levure, *Saccharomyces cerevisiae*, l'actine est codée par un gène unique appelé ACT1. On dispose d'une souche haploïde M1 qui est auxotrophe pour l'uracile ([ura-]), dû à la présence de la mutation *ura3-52* et possède un allèle mutant thermosensible du gène ACT1: *act1-1*. La souche M1 est ainsi incapable de croître à 37°C (phénotype [ts]) alors que sa multiplication est normale à 25 °C. Quand on croise la souche M1 à une souche A : α , *trp1-1*, les diploïdes obtenus sont [ura+] et poussent à 37°C (phénotype [ts+]).

PARTIE I (13 points)

A. On réalise une mutagenèse sur la souche M1 et on a ainsi obtenu 33 souches révertantes indépendantes qui poussent à 37°C ([ts+]) mais qui poussent plus à 14°C (phénotype [cold sensitive] ou [cs] alors que la souche M1 pousse à 14°C.

Expliquez comment procéder ? (schéma)

Quelles hypothèses pouvez-vous faire pour expliquer l'apparition de ces révertants [ts+] ? (5 lignes max)?

Quelles hypothèses pouvez-vous faire pour expliquer leur phénotype [cs] ? (3 lignes max)

B. On croise une des souches révertantes, appelée RCS1 à une souche sauvage. Les diploïdes obtenus sont [ts+, cs+], c'est à dire qu'ils poussent à 37°C et à 14°C Après sporulation on obtient les résultats suivants

19 Tétrades à 2 spores [ts+, cs] et 2 spores [ts+, cs+]

18 Tétrades à 2 spores [ts, cs+] et 2 spores [ts+, cs]

3 Tétrades à 2 spores [ts+, cs], 1 spore [ts+, cs+] et 1 spore [ts, cs+]

Qu'en concluez-vous ?

B. On croise ensuite cette souche RCS1 à une souche *act1-1*.

Le diploïde obtenu est [ts, cs+]. E. Toutes les tétrades obtenues après sporulation ont 2 spores [ts, cs+] et 2 spores [ts+, cs].

Quelles conclusions pouvez-vous en tirer ?

D. Un gène candidat est ainsi identifié que l'on appellera SAC1. On réalise un KO du gène en question, donnant l'allèle *Sac1Δ*. On croise ensuite la souche ACT1 *Sac1Δ* qui est [cs] avec la souche *act1-1* SAC1. Le diploïde obtenu est [ts+].Après sporulation, on obtient les résultats suivants :

10 tétrades à 2 spores [ts+ cs] et 2 spores [ts cs+]

9 tétrades à 2 spore [ts, cs] et 2 spores [ts+, cs+]

2 tétrades à 1 spore [ts+cs], 1 spore [ts cs+], 1 spore [ts, cs] et 1 spore [ts+, cs+]

Comment vous assurer que SAC1est le gène qui est muté dans la souche RCS et qui supprime les effets de la mutation act1-1 dans cette souche ?

E. Par ailleurs, on a pu montrer que la mutation à l'origine de la suppression du phénotype [ts] ne peut pas supprimer une mutation *act1-2* qui est également [ts].

Que pouvez-vous en conclure de l'ensemble des résultats, notamment ceux présentés en D et E ?

PARTIE II 7 points

On réalise une mutagenèse sur une souche diploïde *act1-1/act1-1* et on crible pour des révertants de phénotype [ts+] (qui sont [cs+]). On étudie ensuite l'un de ces révertant appelé RD. On fait sporuler RD et on obtient des tétrades à 2 spores [ts] et 2 spores [ts+].

A. On croise une souche haploïde issue d'une spore [ts+] obtenue dans le croisement précédent avec une souche sauvage *ACT1+*. Le diploïde est [ts+]. Après sporulation on obtient trois types de tétrades :

10 tétrades à 4 spores [ts+]

9 tétrades à 4 spores [ts]

2 tétrades avec 2 spores [ts] et 2 spores [ts+]

Comment interprétez-vous ces trois types de tétrades? Qu'en concluez-vous ? Comment pourriez-vous déterminer les différents génotypes des spores [ts] obtenues dans le second type de tétrades

C. Comment cloneriez-vous le gène dont la mutation supprime l'effet d'*act1-1* dans la souche RD : préciser origine de la banque, souche transformée et critère de sélection ?

On appelle ce gène SAC6. Comment s'assurer que SAC6 correspond bien à au gène muté mute dans la souche RD ? Décrivez précisément ce que vous feriez en écrivant les génotypes et phénotypes attendus

C. Un candidat est ainsi identifié et appelé SAC6. Sa séquence révèle qu'il s'agit d'un gène codant une protéine qui présente une forte similarité de séquence avec une protéine humaine (fimbrine) connue pour lier l'actine. Les allèles de l'actine et de la fimbrine des différentes souches ont été séquencés. La comparaison de la séquence des allèles du gène *ACT1* montre que la mutation *act1-1* correspond à deux mutations adjacentes conduisant à deux changements d'acide aminé : E99->A et E100->A. La comparaison de la séquence des allèles du gène SAC6 montre que la mutation présente dans RD est un changement D 264-> Y. Cet acide aminé est conservé dans la fimbrine humaine et est connu pour être situé dans un domaine de la fimbrine interagissant avec l'actine.

Quelle hypothèse pouvez-vous faire pour expliquer l'effet suppresseur de cette mutation du gène SAC6 sur la mutation *act1-1*?